

На правах рукописи

Руднева Ольга Вячеславовна

**ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ, ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ
ЭФФЕКТИВНОСТЬ И ПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОЧНЫХ
АНТИГЕНОВ ПРОТОСКОЛЕКСОВ ECHINOCOCCUS
MULTILOCULARIS**

Специальность 03.00.19 – паразитология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва – 2006

Работа выполнена во Всероссийском научно-исследовательском институте гельминтологии имени К.И. Скрыбина (ВИГИС).

Научные руководители:

Доктор биологических наук **Бережко В.К.**

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, проф.
Бенедиктов Игорь Иванович
кандидат биологических наук
Андреева Галина Николаевна

Ведущая организация: Московский государственный университет прикладной биотехнологии (МГУПБ)

Защита диссертации состоится 22 марта 2006 г. в 11⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 006.017.01 при Всероссийском научно-исследовательском институте гельминтологии имени К.И. Скрыбина (ВИГИС)

Адрес: 117218, Москва, Б. Черемушkinsкая ул., д. 28.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ВИГИС.

Автореферат разослан 20 февраля 2006 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук



БЕРЕЖКО В.К.

ВВЕДЕНИЕ.

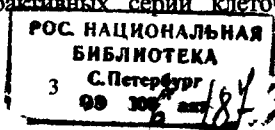
Актуальность проблемы. Цистный и альвеолярный эхинококкозы относятся к числу наиболее опасных гельминтозоонозов, представляющих серьезную угрозу для здоровья человека и являющихся актуальными для ветеринарной медицины. Распространение этих заболеваний за последние годы увеличивается по причине усиления урбанизации, возросшей миграции населения, развала устоявшихся экономических отношений, а также в связи с ухудшением социальных условий жизни и снижения санитарно-эпидемиологического контроля.

Невозможность ранней клинической диагностики ларвального эхинококкоза приводит к необходимости разработки и усовершенствования иммунологических методов, так как полученная с их помощью информация имеет не только диагностическое значение, но может служить также для оценки эпидемической и эпизоотической ситуации. Немаловажное значение для успешной борьбы и профилактики ларвальных цестодозов, как эхинококкозы, приобретает разработка иммунопрофилактических средств на основе специфических антигенов паразита и неспецифических иммуностимулирующих препаратов. Применение иммунопрофилактических средств позволяет значительно повысить сопротивляемость организма, снизить, а в некоторых случаях и предотвратить заражение животных. Проведение полноценных иммунодиагностических и иммунопрофилактических исследований невозможно без наличия активных и высокоспецифичных антигенов, для получения которых в последние годы стали применять биотехнологические методы, к числу которых относятся и клеточная технология. Преимущества клеточной технологии в получении антигенов гельминтов и других биологических объектов сводятся к тому, что клеточные культуры можно приготовить из различных антигеноактивных субстанций паразитов и длительное время сохранять в функциональном состоянии в искусственных питательных средах путем их многократного пассирования. В свете вышеизложенного актуальными представляются исследования по использованию клеточной технологии для получения антигенов протосколексов из вторичных ларвоцист *E. multilocularis* разного возраста и их иммунологической характеристики.

Исходя из этого была поставлена цель - получить «клеточные» антигены из протосколексов *E. multilocularis*, выделенных из 2-, 4- и 6-месячных ларвоцист паразита, провести их иммунохимический анализ, оценить диагностическую эффективность и изучить протективные свойства.

Для выполнения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- 1) Получить 2-, 4- и 6-месячные ларвоцисты *E. multilocularis*, выделить клетки протосколексов и подобрать оптимальные условия их культивирования в искусственных питательных средах для получения клеточных метаболитов.
- 2) Провести отбор антигеноактивных серий клеточных метаболитов («клеточных» антигенов).



- 3) Собрать банк сывороток крови от животных и людей, зараженных *E.granulosus*, *E.multilocularis*, другими гельминтами и клинически здоровых.
- 4) Провести иммунохимический анализ полученных типов «клеточных» антигенов *E.multilocularis* в сравнении с соматическим экстрактом и 3-дневными экскреторно-секреторными продуктами культивируемых *in vitro* протосколексов *E.multilocularis*.
- 5) Оценить диагностическую эффективность иммуноферментной реакции с «клеточными» антигенами разных типов при цистном эхинококкозе человека и животных.
- 6) Изучить протективные свойства «клеточных» антигенов *E.multilocularis* разного возраста в комплексе с иммуномодулятором риботаном, а также с полным адьювантом Фрейнда при экспериментальном альвеолярном эхинококкозе.

Научная новизна

Впервые иммунохимическим анализом с различными антисыворотками установлено 1-2 идентичных антигенных компонента в «клеточных» антигенах протосколексов из 2-, 4- и 6-месячных ларвоцист *E.multilocularis*, соматическом экстракте и 3-дневных экскреторно-секреторных продуктах культивируемых *in vitro* протосколексов паразита. Впервые на основании разработанных параметров постановки иммуноферментной реакции со всеми типами «клеточных» антигенов протосколексов *E.multilocularis* проведена сравнительная оценка их диагностической эффективности при цистном эхинококкозе свиней и человека. Установлена чувствительность иммунотеста при цистном эхинококкозе свиней соответственно 75,6; 73,3; 73,3%; специфичность – 68,9; 72,1; 69,6%; при цистном эхинококкозе человека – 89,66; 89,66; 86,2%; и – 82,07; 86,2; 86,2%. Впервые изучены протективные свойства полученных «клеточных» антигенов протосколексов *E.multilocularis* в комплексе с иммуномодулятором риботаном и с полным адьювантом Фрейнда при экспериментальном эхинококкозе. Эффективность защиты в первом случае составила соответственно 91,7; 91,7; 83,4%; во втором – 80,0; 90,0 и 70,0%.

Практическая значимость

Материалы диссертационной работы Рудневой О.В. вошли в «Методику идентификации "клеточных" антигенов эхинококка», одобренную секцией «Инвазионные болезни животных» Отделения ветеринарной медицины РАСХН.

В заявку на изобретение «Способ профилактики вторичного альвеолярного эхинококкоза (гидатидоза)». Получено положительное решение на выдачу патента №2004129658/13(032366) от 11.10.2004г.

Установленная диссертантом иммунохимическим анализом идентичность антигенов-метаболитов культивируемых в искусственной питательной среде клеток протосколексов *E.multilocularis*, выделенных из 2-, 4 – и 6-месячных ларвоцист паразита, доказывает экономическую

целесообразность использования в культуральной работе для получения «клеточных» антигенов эхинококков ларвоцисты *E.multilocularis* не более 3-4-месячного возраста, что позволит сократить как срок содержания инвазированных экспериментальных животных, так и затраты на их кормление.

Апробация работы.

Материалы диссертационной работы представлены и обсуждены на:

1. Научной конференции «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями» (2002-2004гг).
2. Заседаниях Ученого Совета ВИГИС (2002-2005гг)
3. Секции «Инвазионные болезни животных» «Отделения ветеринарной медицины РАСХН (2005г).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Культивирование клеток протосколексов, выделенных из ларвоцист *E.multilocularis* 2,4 и 6 – месячного возраста, получение «клеточных» антигенов .
2. Иммунохимический анализ «клеточных» антигенов разного типа с использованием кроличьей гипериммунной сыворотки к соматическому экстракту протосколексов паразита, сыворотки человека с подтвержденным диагнозом цистного и альвеолярного эхинококкоза и сыворотки экспериментально зараженных *E.multilocularis* крыс.
3. Оценка диагностической эффективности ИФР с «клеточными» антигенами *E multilocularis* разного типа с сыворотками людей и свиней.
4. Протективные свойства полученных «клеточных» антигенов при экспериментальном альвеолярном эхинококкозе.

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 6 научных работ и 2 работы приняты к публикации.

Объем и структура диссертации. Материалы диссертации изложены на __ страницах машинописного текста. Состоят из введения, обзора литературы, раздела собственных исследований, включающего: материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение, выводы, практические предложения, список литературы и приложение. Список литературы включает __ источников, в том числе __ отечественных и __ зарубежных авторов. Работа иллюстрирована __ таблицами и __ рисунками.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе представлен анализ работ по антигенам эхинококков, их характеристике, диагностической эффективности и достижениям в области иммунодиагностики, а также обзор исследований по иммунопрофилактике ларвальных цестодозов, перспективность этого направления в плане создания антипаразитарных вакцин.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.

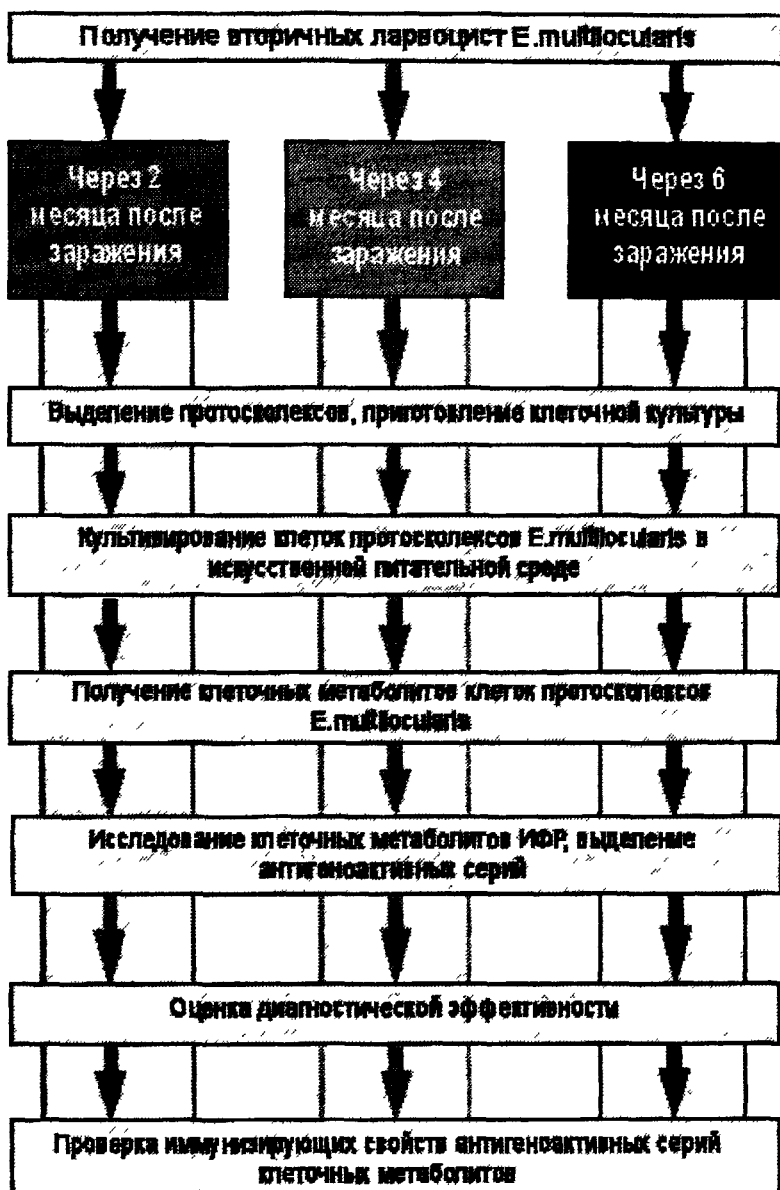
Материалы и методы

Получение инвазивного материала. Для приготовления клеточной культуры из прото-сколексов *E. multilocularis* использовали вторичные ларвоцисты альвеолярного эхинококка, которые выделяли от предварительно зараженных крыс-доноров. Гельминтный материал для заражения крыс-доноров получали из ИМПитМ. Выделенными из вторичных ларвоцист паразита в стерильных условиях протосколексами и ацефалоцистами заражали крыс в дозе 4000-6000 экземпляров на одно животное внутрибрюшинно в физрастворе с антибиотиками.

Убой экспериментально зараженных крыс проводили в сроки, предусмотренные целью наших дальнейших исследований, а также при необходимости заражения новой партии животных-доноров.

Получение вторичных ларвоцист E. multilocularis 2, 4 и 6 – месячного возраста, приготовление первичной клеточной культуры протосколексов, проверка ее жизнеспособности. Работу с гельминтным материалом *E. multilocularis* проводили в стерильном боксе в ламинаре с вытяжкой. Ларвоцисты паразита 2, 4 и 6-месячного возраста получали от животных-доноров, отдельно измельчали ножницами или с помощью мясорубки до гомогенного состояния. Каждую порцию гомогената, полученную от разновозрастных ларвоцист *E. multilocularis*, промывали стерильным физиологическим раствором (0,9%) хлористого натрия над мельничным газом с диаметром ячейки 0,3 мм. Филтрат распределяли в цилиндры с коническим дном и отстаивали в течение 15-20 минут. Затем надосадочную жидкость отсасывали резиновой грушей со вставленной в ее конец пастеровской пипеткой и заменяли свежим физиологическим раствором. Содержимое цилиндров взбалтывали путем пропускания воздуха из груши и после 10-15 минут отстаивания снова удаляли надосадочную жидкость и заменяли свежим физиологическим раствором. Эту операцию повторяли 5-7 раз, постепенно сокращая срок отстаивания с целью очистки протосколексов от обрывков выводковых капсул, а также от погибших протосколексов, которые осаждаются с меньшей скоростью, чем живые. Для приготовления первичной клеточной культуры отмытый материал подвергали нежной гомогенизации в течение 5-7 мин в ручном гомогенизаторе с добавлением 0,5-1,0 мл стерильного физиологического раствора (0,9%) до получения однородной массы. Полученную гомогенную массу пропускали

Схема проведения экспериментальных исследований



через фильтры с диаметром ячеек 220, 110 и 50 мкм. Процесс гомогенизации и отделения клеток повторяли 3-5 раз. Качество гомогенизации и определение жизнеспособности выделенных клеток проводили на предметном стекле при увеличении микроскопа 20x10.

Полученную суспензию клеток помещали в стерильную центрифужную пробирку, добавляли физраствор с антибиотиками (по 500 ЕД/мл пенициллина) и центрифугировали при 1000-1200 об/мин в течение 5-7 минут. Процедуру отмывания повторяли не менее 5-7 раз. Жизнеспособность полученных клеток из протосколексов *E. multilocularis* проверяли в камере Горяева путем окрашивания 0,4% раствором трипанового синего при увеличении микроскопа 20x10 общепринятым методом. Культуры, содержащие не менее 85-87% жизнеспособных клеток, использовались в дальнейшей работе. Концентрацию клеток в суспензии для последующего культивирования доводили до 600-800 тыс/мл.

Культивирование клеток протосколексов из ларвоцист *E. multilocularis* разного возраста, получение клеточных метаболитов, оценка их антигенной активности. В качестве ростовой среды для культивирования клеток использовали искусственную питательную среду постоянного состава - RPMI-1640 с добавлением 2 мл глутамин и 8 мг гентамицина (4%) на 100 мл среды и 5% эмбриональной сыворотки плода крупного рогатого скота.

Клеточную культуру помещали в CO₂-инкубатор с заданными параметрами температуры (37°С) и поступления газов (CO₂-5%) при 70%-й влажности для культивирования. Отбор клеточных метаболитов производили на 7-10 день культивирования в период формирования монослоя с помощью автоматической пипетки, причем после каждой манипуляции проводили замену наконечника. После отбора метаболитов культуры клеток пересевали в новую порцию питательной среды необходимого состава, подогретой в водяной бане до 37°С.

Процесс роста и пролиферации клеток в питательных средах контролировали под микроскопом. Поскольку получение полноценной популяции возможно только от культуры, состоящей из жизнеспособных клеток, то перед каждым пассажем проводили просмотр и оценку качества клеток в монослое. Для продолжения культивирования отбирали культуры, содержащие клетки, имеющие типичную для данной культуры морфологию с четко очерченными границами между клетками. Если в поле зрения регистрировали клетки с вакуолями, включениями и другими признаками цитопатологии, такие культуры для культивирования не применяли. Из планшетов с выросшим клеточным монослоем отбирали ростовую среду (клеточные метаболиты), а к оставшимся на пластике клеткам добавляли необходимое количество соответствующей ростовой среды, подогретой до 37°С.

Наличие специфических антигенных компонентов в метаболитах клеточных культур протосколексов *E.multilocularis* устанавливали с помощью иммуноферментной реакции типа ELISA (Voller A. et al., 1974) с некоторыми модификациями применительно к нашим условиям. Реакцию проводили в полистироловых планшетах отечественного производства. Положительным контролем в реакции при отборе антигеноактивных серий метаболитов клеток служили сыворотки убойных свиней с подтвержденным диагнозом естественной инвазии *E.granulosus* и сыворотки людей, зараженных *E.granulosus* и *E.multilocularis* (диагноз подтвержден хирургически), а отрицательным - сыворотки свиней, у которых при вскрытии гельминтной инвазии не обнаружили, и сыворотки здоровых людей - доноров.

Антиген использовали в титре 1/2 и 1/4. Разведение осуществляли карбонатно-бикарбонатным буфером (БКБ), pH 9,6. Сенсибилизацию планшета проводили при +4°C в течение 18-20 часов с последующим отмыванием несвязавшихся с полистиролом белков 0,05% раствором Tween-20 на дистиллированной воде три раза по 3-5 минут после каждого этапа реакции. Сыворотки крови разводили 1:100 в 0,01 М фосфатно-солевом буфере (ФСБ), pH 7,2, с добавлением 0,05% Tween-20 и 0,05% бычьего сывороточного альбумина (БСА). В качестве конъюгата использовали антитела диагностические против IgG сыворотки крови человека, а также антитела диагностические против IgG сыворотки крови свиньи, меченные пероксидазой. Разведение конъюгата проводили тем же буфером, что и сыворотки, увеличив концентрацию БСА в 10 раз. Планшеты с сывороткой и конъюгатом инкубировали при +37°C в течение одного часа. В качестве субстрата применяли ортофенилендиамин на цитратном буфере, pH 4,7, с добавлением стабилизированной перекиси водорода. Реакцию останавливали внесением в каждую лунку 50% серной кислоты в количестве 50 мкл. Оптимальные разведения всех компонентов (антиген, сыворотка и конъюгат), используемых в реакции, устанавливали опытным путем на основе максимальной разницы в оптической плотности между отрицательной и положительной контрольными сыворотками.

Учет реакции проводили на автоматическом анализаторе колориметрическом иммуноферментном 340/ATC фирмы SLT-labsystems (Австрия) при длине волны 492 нм. Пробу считали положительной, если ее оптическая плотность превосходила значение оптической плотности отрицательного контроля в два и более раза. Оценку результатов проводили только в том случае, если в лунках с отрицательной контрольной сывороткой и без сыворотки (контроль конъюгата) окраска была слабо-желтая или отсутствовала.

Серии метаболитов клеточных культур, показавших хорошую антигенную активность с контрольными сыворотками, использовали в дальнейшей работе.

Контроль клеточных метаболитов на стерильность, безвредность, определение содержания белка

Контроль клеточных метаболитов на стерильность

Для обнаружения контаминации бактериями, грибами и микоплазмами пробу «клеточного» антигена высевали на МПА, МПБ и МППБ по одной пробирке, а на грибковую контаминацию - на среду (агар) Сабуро в две пробирки. На микоплазменную контаминацию пробу «клеточного» антигена высевали на полужидкий агар (0,3%), приготовленный на ферментативном переваре бычьего сердца с 10% сыворотки лошади, 10% дрожжевого экстракта и 100 ЕД/мл пенициллина в две пробирки. Контроль вели в течение трех пассажей на этой среде. Посевы на МПА, МПБ и МППБ выдерживали в течение 10 суток при 37 °С, на полужидком агаре - 14 дней при 37 °С и на среде Сабуро - 15 дней при комнатной температуре. При обнаружении хотя бы одного из контаминантов партию считали нестерильной.

Контроль на безвредность. Испытания проводили на 10 белых беспородных мышах, не использовавшихся ранее в экспериментах. Для выявления посторонних вредных агентов каждому животному внутримышечно вводили «клеточный» антиген в дозе 0,5 мл. Наблюдение вели на протяжении 28 суток. «Клеточный» антиген считали безвредным, если на протяжении периода наблюдения животные оставались клинически здоровыми.

Определение содержания белка. Концентрацию белка в клеточных метаболитах определяли на спектрофотометре СФ -26, ЛОМО, при длине волны 280 нм.

В качестве контроля использовали питательную среду культивирования.

Иммунохимический анализ метаболитов («клеточных» антигенов) культивируемых протосколексов из 2, 4 и 6 – месячных ларвоцист E. multilocularis

Иммунохимический анализ «клеточных» антигенов протосколексов из 2, 4 и 6 – месячных ларвоцист E. multilocularis проводили реакцией иммунодиффузии (РИД) в 1%-ном агаровом геле (Difco) в варианте «семерка», «пятерка», «тройка». РИД ставили по методу Гусева и Цветкова (1960) в модификации применительно к нашим условиям. Для анализа антигенного спектра исследуемых объектов использовали:

а) гипериммунную кроличью сыворотку к антигенам соматического экстракта протосколексов паразита;

Гипериммунную сыворотку получали от 2 кроликов, которых иммунизировали 3-хкратно подкожно с интервалом 2-3 дня возрастающими дозами соматического экстракта протосколексов E. multilocularis с последующей внутривенной реиммунизацией, проведенной через 28 дней после последней иммунизирующей дозы антигена. В общей сложности каждый кролик получал по 7,2 мг белка-антигена. Через 7-10 дней после

реиммунизации у кроликов из ушной вены была взята кровь и приготовлена сыворотка.

Активность гипериммунной сыворотки предварительно проверяли ИФР.

б) сыворотки пациентов с хирургически подтвержденным диагнозом цистного и альвеолярного эхинококкоза приобретали из 24-й клинической больницы г.Москвы.

с) сыворотки от экспериментально зараженных *E. multilocularis* белых крыс нам предоставил д.м.н. Коваленко Ф.П.

Исследование «клеточных» антигенов протосколексов из разновозрастных ларвоцист E. multilocularis иммуноферментной реакцией (ИФР)

а) с сыворотками свиней;

Отобранные в процессе культуральной работы антигеноактивные серии клеточных метаболитов («клеточные» антигены) протосколексов из 2, 4 и 6-месячных ларвоцист *E.multilocularis* были оценены иммуноферментным методом (типа ELISA) на твердой фазе в непрямом варианте определения антител к антигенам эхинококка однокамерного в сыворотках убойных свиней. Исследовали 135 и 124 сыворотки свиней, приобретенных в Московской и Саратовской областях. В состав этих сывороток входило 45 с подтвержденным при вскрытии диагнозом цистного эхинококкоза, 90 и 79 проб от инвазированных другими гельминтами и клинически здоровых животных без видимой патологии.

б) с сыворотками людей.

Сравнительную оценку отобранных «клеточных» антигенов протосколексов, выделенных из 2, 4 и 6-месячных ларвоцист *E.multilocularis*, провели иммуноферментным тестом типа ELISA с сыворотками людей, приобретенных из 24-й клинической больницы г.Москвы и из НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи. Для анализа использовали 60 проб сывороток, в том числе 29 проб с подтвержденным хирургически диагнозом цистного и 2-альвеолярного эхинококкоза, 2 пробы от пациентов с серологически подтвержденной инвазией токсокароза «larva migrans»; 2 – трихинеллеза (*T.spiralis*) и 25 проб сывороток от клинически здоровых доноров.

ИФР ставили по стандартной методике Voller et al., (1974), предварительно определив оптимальное разведение «клеточных» антигенов и титр конъюгата на основе максимальной разницы в проявлении реакции (по оптической плотности) между положительной и отрицательной контрольной сывороткой. В качестве конъюгата при анализе сывороток свиней использовали антитела диагностические против IgG сыворотки крови свиней, меченные пероксидазой, а при работе с сыворотками людей – антитела диагностические против IgG сыворотки человека, меченные пероксидазой.

Изучение иммунопрофилактических свойств «клеточных» антигенов при вторичном альвеолярном эхинококкозе мышей в комплексе а) с иммуномодулятором риботаном:

Непосредственно перед проведением экспериментов на лабораторных животных-моделях определяли необходимое количество иммунизирующей дозы «клеточных» антигенов *E.multilocularis* (по белку) в объемном выражении и смешивали с рассчитанной согласно инструкции дозой иммуномодулятора риботана. Приготовленные партии иммунопрепаратов, представляющих собой смесь «клеточных» антигенов протосколексов из вторичных ларвоцист *E.multilocularis* 2, 4 и 6 – месячного возраста (отдельно каждый) и риботана, использовали в эксперименте по изучению их протективных свойств при вторичном альвеолярном эхинококкозе на мышах. Разовая иммунизирующая доза иммунопрепарата составляла 0,2 мл (80 мкг белка) «клеточного» антигена и 5 мкл риботана. Аналогичный иммунопрепарат был приготовлен также из 3-дневных экскреторно-секреторных продуктов протосколексов паразита, который использовали как базовый контрольный. Опыт провели на 120 белых беспородных мышах, массой 18-20г, распределенных на 10 равноценных групп по 12 мышей в каждой.

Первые 4 группы мышей получили 3-кратно подкожно с интервалом 10 дней по 0,2 мл иммунопрепарата из соответствующего «клеточного» и экскреторно-секреторного антигена и 5 мкл риботана, последующие 4 группы были иммунизированы аналогично такой же дозой соответствующих испытуемых антигенов без иммуномодулятора риботана, 9-я группа животных получала только дозу иммуномодулятора и 0,2 мл стерильного физиологического раствора, а 10-я группа – контрольные мыши, иммунизации не подвергались, им вводили по 0,2 мл стерильного физиологического раствора.

Через 14 дней после последней иммунизирующей дозы все подопытные мыши были заражены инвазивным материалом *E.multilocularis* в дозе 200±20 экз. протосколексов и ацефалоцист. Убой подопытных животных и оценку протективной эффективности «клеточных» антигенов проводили на 70-й и 90-й дни после заражения.

б) с полным адьювантом Фрейнда.

Аналогичный эксперимент по оценке иммунопрофилактических свойств «клеточных» антигенов протосколексов из 2,4 и 6-месячных ларвоцист паразита провели с использованием в качестве иммуностимулирующего средства полного адьюванта Фрейнда (ПАФ). Перед началом эксперимента произвели расчет необходимого количества каждой партии «клеточного» антигена из протосколексов *E.multilocularis* в объемном выражении и тщательно перемешали с ПАФ (в соотношении 1:0,5) до получения гомогенной массы. Расчет вели по белку таким образом, чтобы каждое иммунизированное животное получило по 0,2 мл приготовленного иммунопрепарата, содержащего 80 мкг белка-антигена.

Опыт провели на 70 белых беспородных мышах, массой 18-20 г, распределенных на 7 равноценных групп по 10 животных в каждой группе. Иммунизацию мышей проводили 3-кратно подкожно с интервалом 10 дней.

Первые три группы мышей получили подкожно 3-кратно с интервалом 10 дней иммунопрепараты, приготовленные из «клеточных» антигенов протосколексов 2, 4 и 6 – месячных ларвоцист *E.multilocularis* в смеси с ПАФ соответственно. Четвертая, пятая и шестая группы мышей были иммунизированы таким же образом «клеточными» антигенами протосколексов из разновозрастных ларвоцист альвеолярного эхинококка в той же дозе, но без ПАФ, седьмая контрольная группа животных иммунизации не подвергалась. По истечении 14 дней всех подопытных мышей заражали подкожно инвазивным материалом *E.multilocularis* в дозе 200±20 протосколексов и ацефалоцист.

Убой и оценку иммунопрофилактического эффекта проводили в те же сроки, что и в первом опыте.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты исследований показали, что не все серии клеточных метаболитов содержат антигеноактивные компоненты. Антигенную активность установили в 20 (90,9%), 24 (91,6%) и 25 (78,1%) сериях клеточных метаболитов протосколексов из 2, 4 и 6 – месячных ларвоцист *E.multilocularis* соответственно. Концентрация белка в «клеточных» антигенах протосколексов составила 2175, 4600 и 3500 мкг/мл соответственно.

Анализ результатов иммунохимических исследований (табл.1), проведенных реакцией иммунодиффузии (РИД) с использованием гипериммунной кроличьей сыворотки к антигенам соматического экстракта протосколексов *E.multilocularis*, показал в гомологичной системе не менее 5-6 комплексов антиген-антитело, которые проявлялись в основном четкими линиями преципитации.

Таким образом, соматический экстракт протосколексов, судя по РИД, имеет в своем составе не менее 6 антигенных компонентов (эпитопов), способных стимулировать синтез антител у иммунизированных им кроликов.

Аналогичные исследования, проведенные с «клеточными» антигенами из протосколексов, выделенных из 2, 4 и 6-месячных ларвоцист паразита и этой же антисывороткой, позволили выявить не более 1-2 комплексов антиген-антитело. Причем представляющие эти комплексы линии преципитации были четкими и показали реакцию идентичности с таковыми в гомологичной системе реакции.

В варианте «пятачка», где в центральную лунку вносили сыворотку человека с подтвержденным диагнозом цистного эхинококкоза, а по периферии - соматический экстракт протосколексов, 3-дневные экскреторно-секреторные продукты

Таблица 1.

Иммунохимический анализ «клеточных» антигенов протосколексов
E.multilocularis.

№ п/п	Сыворотки	Число комплексов антиген-антитело в реакции иммунодиффузии				
		Антигены				
		Экстракт протоско- лексов <i>E.multilo- cularis</i>	3-дневные экскреторно- секре-торные продукты протоско- лексов <i>E.multilo- cularis</i>	«клеточный» АГ протосколек- сов из 2- месячных ларвоцист <i>E.multilocularis</i>	«клеточный» АГ протосколек- сов из 4- месячных ларвоцист <i>E.multiloculari s</i>	«клеточ- ный» АГ из протоско- лексов 6- месячных ларвоцист <i>E.multilocul aris</i>
1.	Кроличья гипериммунная (а)	5	1-2	1-2	1-2	1
2.	Кроличья гипериммунная (б)	6	2	2	2	1-2
3.	Цистный эхинококк (человек)	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2
4.	Альвеолярный эхинококк (человек)	1	1	1	1-2	1
5	Альвеолярный эхинококк (крыс, эксп. заражение)	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2

Примечания. АГ – антиген

культивируемых *in vitro* протосколексов паразита и «клеточные» антигены протосколексов, выделенных из 2, 4 и 6 –месячных вторичных ларвоцист *E.multilocularis*, в РИД выявили не более двух комплексов антиген-антитело. Линии преципитации, представляющие эти комплексы в агаровом геле с сывороткой больного цистной формой эхинококкоза, имели более диффузный характер в сравнении с реакцией, наблюдаемой с гипериммунной сывороткой

Аналогичный вариант реакции провели с сыворотками экспериментально зараженных *E.multilocularis* крыс, где также регистрировали не более 1-2 комплексов антиген-антитело. Полученные нами данные подтверждают мнение исследователей иммунологов об отсутствии корреляции между числом потенциальных и функциональных антигенных компонентов.

Оценка диагностической эффективности «клеточных» антигенов протосколексов *E.multilocularis* из 2, 4 и 6 – месячных ларвоцист при цистном эхинококкозе свиней и человека.

а) при эхинококкозе свиней

Результаты иммуноферментного анализа «клеточных» антигенов из 2-месячных протосколексов паразита, представленные в табл.2, показали, что из 45 проб сывороток инвазированных эхинококками свиней 34 прореагировали положительно, а 11 – отрицательно. Таким образом, чувствительность теста с этим антигеном составила 75,6%, а специфичность – 68,90%

Таблица 2.

*Диагностическая эффективность «клеточного» антигена протосколексов из 2-месячных ларвоцист *E.multilocularis* при цистном эхинококкозе свиней.*

№ п/п	Исследуемые сыворотки крови свиней.	Кол- во проб	«Клеточный» АГ протосколексов из 2- месячных ларвоцист <i>E.multilocularis</i>			
			Результаты ИФР*			
			+	-	Ч, %	С,%
1	Инвазированные <i>E. granulosus</i>	45	34	11	75,6%	
2	Инвазированные другими гельминтами и клинически здоровые	90	28	62		68,9%

Примечания.

ИФР – иммуноферментная реакция

АГ – антиген

«Ч» - чувствительность

«С» - специфичность

«+» - положительный результат

«-» - отрицательный результат

Аналогичные исследования, проведенные с «клеточным» антигеном протосколексов из 4- и 6-месячных ларвоцист *E.multilocularis*, со 124 сыворотками крови свиней, представленные в табл.3 и 4, показали следующие результаты: из 45 проб сывороток крови свиней, инвазированных *E. granulosus*, в 33 реакция с обоими антигенами была положительной, в 12 – отрицательной. Таким образом, чувствительность ИФР с этими антигенами составила 73,3%.

Таблица 3.

Диагностическая эффективность «клеточного» антигена протосколексов из 4-месячных ларвоцист *E. multilocularis* при цистном эхинококкозе свиней.

№ п/п	Исследуемые сыворотки крови свиней	Кол-во проб	«Клеточный» АГ протосколексов из 4-месячных ларвоцист <i>E. multilocularis</i>			
			Результаты ИФР*			
			+	-	Ч, %	С, %
1	Инвазированные <i>E. granulosus</i>	45	33	12	73,3%	
2	Инвазированные другими гельминтами и клинически здоровые	79	22	57		72,1%

Примечания: ИФР – иммуноферментная реакция
 АГ – антиген
 «Ч» - чувствительность
 «С» - специфичность
 «+» - положительный результат
 «-» - отрицательный результат

Таблица 4.

Диагностическая эффективность «клеточного» антигена протосколексов из 6-месячных ларвоцист *E. multilocularis* при цистном эхинококкозе свиней.

№ п/п	Исследуемые сыворотки крови свиней.	Кол-во проб	«Клеточный» АГ протосколексов из 6-месячных ларвоцист <i>E. multilocularis</i>			
			Результаты ИФР*			
			+	-	Ч, %	С, %
1	Инвазированные <i>E. granulosus</i>	45	33	12	73,3%	
2	Инвазированные другими гельминтами и клинически здоровые	79	24	55		69,6%

Примечания: ИФР – иммуноферментная реакция
 АГ – антиген
 «Ч» - чувствительность
 «С» - специфичность
 «+» - положительный результат
 «-» - отрицательный результат

В то же время оценка специфичности этих антигенов, проведенная с 79 пробами сывороток крови свиней с другими инвазиями и клинически здоровых, несколько различалась.

Так, с «клеточным» антигеном из 4-месячных протосколексов паразита 57 проб сывороток прореагировали в ИФР отрицательно, что составило 72,1% специфичности. С «клеточным» антигеном из 6-месячных ларвоцист *E.multilocularis* отрицательная реакция была зарегистрирована в 55 случаях, что соответствует специфичности 69,6%.

б) при эхинококкозе человека

Исследования, проведенные с сыворотками крови людей (табл.5) в количестве 60 проб, в том числе с сывороткой крови пациентов с подтвержденным диагнозом цистного (29 проб) и альвеолярного эхинококкоза (2 пробы), трихинеллеза (2 пробы), токсокароза «larva migrans» (2 пробы) и клинически здоровых доноров (25 проб) показали следующие результаты: из 29 проб сывороток крови пациентов с диагнозом цистного эхинококкоза с «клеточным» антигеном протосколексов из 2-месячных ларвоцист 26 прореагировали положительно, 3 – отрицательно. Таким образом, чувствительность теста в этом случае составила 89,66%. С обоими сыворотками крови пациентов с альвеолярной формой эхинококкоза реакция была положительной, что соответствует 100%-ной чувствительности.

С сыворотками крови пациентов с гетерологичными инвазиями и клинически здоровых-доноров результаты анализа были следующие: при трихинеллезе из 2 сывороток одна показала положительный результат, при токсокарозе «larva migrans» из 2 также одна прореагировала положительно, а из 25 проб сывороток крови клинически здоровых пациентов положительную реакцию регистрировали в 3 случаях (12,0%). Специфичность ИФР без учета данных по альвеолярному эхинококкозу, таким образом, составила 82,07%. Аналогичный анализ, проведенный ИФР с этим же набором сывороток крови людей и «клеточным» антигеном протосколексов из 4-месячных ларвоцист *E.multilocularis* показал такую же чувствительность теста 89,66%, поскольку из 29 проб сывороток крови больных цистной формой эхинококкоза положительную реакцию регистрировали в 26 случаях.

Судя по результатам иммуноферментного анализа с сыворотками крови пациентов с гетерологичными инвазиями и клинически здоровых доноров специфичность теста составила 86,2%.

ИФР с «клеточным» антигеном протосколексов из 6-месячных вторичных ларвоцист паразита и тех же сывороток крови пациентов показала чувствительность и специфичность 86,2%. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что клетки протосколексов, выделенных из разного возраста ларвоцист *E.multilocularis*, при культивировании в искусственной питательной среде при оптимально подобранных условиях активно растут и размножаются, выделяя в среду обитания антигеноактивные продукты метаболизма, имеющие диагностическое значение.

Таблица 5.

Сравнительная диагностическая эффективность «клеточных» антигенов из протосколексов ларвоцист *E. multilocularis* разного возраста при цистном эхинококкозе человека.

Группы людей, Пробы сывороток	Кол-во проб	Результаты ИФР*											
		Клеточный АГ прото- сколексов из 2-месячных ларвоцист <i>E. multilocularis</i>				Клеточный АГ прото- сколексов из 4-месячных ларвоцист <i>E. multilocularis</i>				Клеточный АГ прото- сколексов из 6-месячных ларвоцист <i>E. multilocularis</i>			
		+	-	Ч%	С%	+	-	Ч%	С%	+	-	Ч%	С%
Эхинококкоз цистный	29	26	3	89,66	82,07	26	3	89,66	86,2	25	4	86,2	86,2
Эхинококкоз альвеолярный	2	2	-	100		2	-	100		2	-	100	
Трихинеллез	2	1	1			1	1			1	1		
Токсокароз " <i>Larva migrans</i> "	2	1	1			1	1			1	1		
Клинически здоровые доноры	25	3	22			2	23			2	23		
Итого	60												

Примечания: ИФР - иммуноферментная реакция

«Ч» - чувствительность

«С» - специфичность

АГ - антиген

«+» - положительный результат

«-» - отрицательный результат

Сопоставимость полученных нами данных в диагностических исследованиях со всеми испытанными антигенными препаратами свидетельствует о том, что набор антигеноактивных компонентов в клеточных метаболитах протосколексов из разновозрастных ларвоцист *E.multilocularis* практически не отличается, поскольку разница в чувствительности и специфичности иммунотеста с этими антигенами была незначительной.

Изучение иммунопрофилактических свойств «клеточных» антигенов протосколексов при экспериментальном вторичном альвеолярном эхинококкозе мышей

а) в комплексе с иммуномодулятором риботаном

Анализ результатов этих исследований мы провели на 90-й день после проверочного заражения экспериментальных животных.

Суммирование полученных нами данных, представленных в таблице 6, свидетельствует о том, что наибольший эффект защиты достигался при иммунизации мышей специфическим антигенным препаратом в комплексе с иммуностимулятором риботаном (группы I, III и V табл. 6.).

В первой группе мышей, иммунизированных 'клеточным' антигеном протосколексов из 2-месячных ларвоцист паразита в комплексе с риботаном, только у одной мыши при вскрытии в печени обнаружили ларвоцисты *E.multilocularis*, размером менее 1,5 мм в диаметре без инвазивных элементов. Аналогичный результат регистрировали в 3-й группе, мыши которой были иммунизированы таким же антигеном протосколексов, выделенных из 4-месячных ларвоцист альвеолярного эхинококка. Таким образом, в этих группах был отмечен самый высокий защитный эффект (91,7%). Из 12 мышей 5-й группы, иммунизированных "клеточным" антигеном протосколексов из 6-месячных ларвоцист паразита с риботаном, у 2 были обнаружены в печени единичные, мелкие без зародышевых элементов, ларвоцисты, что повлияло на протективный эффект и снизило его до 83,4%.

Что касается мышей, которых иммунизировали только антигенными препаратами, без иммуномодулятора (группы 2,4,6, табл 6), то эффективность защиты у них не превышала 75% (2,4 группа) и 66,7% (6 группа). В этих группах, как правило, у 3-4 подопытных мышей регистрировали единичные ларвоцисты паразита без зародышевых элементов в отличие от таковых, обнаруженных у контрольных животных, не подвергавшихся иммунизации. У последних многочисленные ларвоцисты находили в брюшной полости и во всех внутренних органах, размером до 25 мм в диаметре с развившимися протосколексами. Большинство контрольных мышей погибло до момента вскрытия.

Таблица 6.

Протективные свойства «клеточного» антигена (КлАГ) протосколексов из 2-, 4 и 6- месячных лавроцист *E. multilocularis* в комплексе с иммуномодулятором риботаном при экспериментальном альвеолярном эхинококкозе мышей.

Номера п/п	Коли- чество мышей в группе	Иммуни- зирующее средство, мкг белка*	Доза заражения, ** экз	Кол-во заразив- шихся животных, %	Эффектив- ность защиты, %	Примечание
I	12	Кл АГ 2-мес 80 мкг (0,2 мл) + риботан 5 мкг	200 ± 20	1(8,33 %)	91,7%	У одной мыши обнаружены единичные лавроцисты в печени без инвазивных элементов.
II	12	Кл АГ 2-мес. 80 мкг (0,2 мл) + физ. р-р 5 мкг	200 ± 20	3(25,0%)	75,0%	У трех мышей обнаружены лавроцисты 1,5-2 мм в диаметре, зародышевые элементы отсутствовали
III	12	Кл АГ 4-мес. 80 мкг (0,2 мл) + риботан 5 мкг	200 ± 20	8,33%	91,7%	У двух мышей регистрировали очень мелкие единичные, без зародышевых элементов лавроцисты в печени
IV	12	Кл АГ 4-мес 80 мкг (0,2 мл) + физ. р-р 5 мкг	200 ± 20	3(25,0%)	75,0%	У трех мышей регистрировали во внутренних органах лавроцисты паразита без зародышевых элементов
V	12	Кл АГ 6-мес 80 мкг (0,2 мл) + риботан 5 мкг	200 ± 20	2(16,6%)	83,4%	У трех мышей регистрировали мелкие, единичные лавроцисты, без инвазивных элементов.
VI	12	Кл АГ 2-мес 80 мкг (0,2 мл) + физ. р-р 5 мкг	200 ± 20	4(33,3%)	66,7%	У четырех мышей обнаружены лавроцисты до 2 мм в диаметре, зародышевые элементы отсутствовали
VII	12	ЭСП 80 мкг (0,2 л) + риботан 5 мкг	200 ± 20	3(25,0%)	75,0%	В печени трех мышей регистрировали лавроцисты 0,5-2,5 мм в диаметре, зародышевые элементы отсутствовали
VIII	12	ЭСП 80 мкг (0,2 л) + физ. р- р 5 мкг	200 ± 20	5(41,7%)	58,3	В печени и брюшной полости пяти мышей обнаружены лавроцисты без зародышевых элементов
IX	12	Физ. р-р (0,2 мл) + риботан 5 мкг	200 ± 20	10(83,3%)	16,7%	У большинства заразившихся мышей регистрировали лавроцисты с зародышевыми элементами в брюшной полости и в печени
X	12	Физ. р-р 0,2 мл	200 ± 20	12(100%)	-	Все мыши заразились, лавроцисты дл. 15-25 мм в брюшной полости и во внутренних органах протосколексами

Примечание: «Кл»АГ Е m - «клеточный» антиген *Echinococcus multilocularis*
«Кл»АГ Е m +Р - «клеточный» антиген *Echinococcus multilocularis* + риботан
ЭСП - экскреторно-секреторные продукты

Подопытные животные, получившие в качестве иммунизирующего препарата только иммуностимулятор риботан (группа 9), как показали результаты вскрытия, оказались в большинстве зараженными У 10 мышей из этой группы регистрировали многочисленные достаточно больших размеров ларвоцисты с зародышевыми элементами паразита и только у 2 (16,6%) такие поражения отсутствовали. В качестве базового антигена в иммунопрофилактических исследованиях мы использовали 3-дневные экскреторно-секреторные продукты (ЭСП) культивируемых протосколексов *E.multilocularis*, которые также вводили мышам в комплексе с риботаном (группа 7) и без него (группа 8). В результате этих исследований установили, что защитный эффект в первом случае составил 75,0%, во втором – 58,3%.

Таким образом, использование всех типов антигенов в комплексе с иммуномодулятором риботаном оказывало наибольший защитный эффект и предохраняло больше животных от последующего проверочного заражения.

Полученные нами данные позволяют сделать предварительное заключение, что «клеточные» метаболиты протосколексов *Echinococcus multilocularis*, выделенные из 2-, 4- и 6- месячных ларвоцист паразита, имеют в своем составе антигены, обладающие защитными свойствами.

б) в комплексе с полным адьювантом Фрейнда

Аналогичные исследования по оценке протективных свойств "клеточных" антигенов протосколексов из разновозрастных ларвоцист альвеолярного эхинококка мы провели также в комплексе с полным адьювантом Фрейнда (ПАФ). Полученные результаты, представленные в табл.7, явились убедительным подтверждением данных первого эксперимента с иммуномодулятором риботаном о наличии в "клеточных" антигенах протосколексов из разновозрастных ларвоцист *E.multilocularis* иммунопрофилактических компонентов, способных в значительной степени предохранять иммунизированных ими животных от последующего заражения. Убой экспериментальных мышей, проведенный на 90-й день после проверочного заражения, показал, что животные, иммунизированные "клеточными" антигенами протосколексов из ларвоцист альвеолярного эхинококка 2,4 и 6-месячного возраста в комплексе с ПАФ (группы 1,2,3), в большинстве своем оставались свободными от инвазии. Эффективность защиты составила 80,0; 90,0; 70,0 %. Причем у мышей этих групп, у которых регистрировали единичные ларвоцисты без инвазивных элементов, отметили существенные различия в сравнении с контрольной группой, не подвергавшейся иммунизации. У последних, как правило, в эти же сроки убоя регистрировали многочисленные ларвоцисты паразита в печени и в брюшной полости, довольно значительных размеров (15-20мм в дм) с большим числом инвазивных элементов. В последующих трех группах (4;5,6) мышей, иммунизированных теми же «клеточными» антигенами протосколексов паразита без адьюванта, защитный эффект к проверочному заражению проявился слабее и был в пределах 50-60%. Однако и в этих группах заразившиеся мыши отличались от контрольных, не подвергавшихся предварительной иммунизации, как по количеству обнаруженных у них

ларвоцист эхинококка, так и по их размерам и наличию инвазивных элементов.

Таблица 7.

Протективные свойства «клеточного» антигена (КлАГ) протосколексов из 2, 4 и 6-месячных ларвоцист E. multilocularis в комплексе с полным адьювантом Фрейнда (ПАФ) при экспериментальном альвеолярном эхинококкозе мышей.

Номера п/п	Количество мышей в группе	Иммунизирующее средство, доза*мкг белка*	Доза заражения,** экз	Кол-во заразившихся животных, %	Эффективность защиты, %	Примечание
I	10	Кл АГ 2-мес 80 мкг + ПАФ (0.2мл)	200 ± 20	2(20%)	80%	У двух мышей обнаружены ларвоцисты до 1,5 мм в диаметре, без инвазивных элементов
II	10	Кл АГ 4-мес 80 мкг + ПАФ (0.2мл)	200 ± 20	1(10,0%)	90%	Ларвоцист паразита регистрировали у одной мыши. Они мелкие, без зародышевых элементов
III	10	Кл АГ 6-мес 80 мкг (0.2мл) + ПАФ	200 ± 20	3(30%)	70%	У трех мышей регистрировали ларвоцисты в брюшной полости
IV	10	Кл АГ 2-мес 80 мкг (0.2мл)	200 ± 20	5(50,0%)	50%	Половина мышей в группе были инвазированы, только у одной мыши в ларвоцистах обнаружены инвазивные элементы
V	10	Кл АГ 4-мес 80 мкг (0.2мл)	200 ± 20	4(60,06%)	60%	У четырех мышей этой группы регистрировали единичные, мелкие ларвоцисты, без зародышевых элементов
VI	10	Кл АГ 6-мес 80 мкг (0.2мл)	200 ± 20	4(40,0%)	60%	У четырех мышей найдены многочисленные мелкие, без инвазивных элементов ларвоцисты
VII	10	Физиол р-р (0.2мл) (контроль)	200 ± 20	10(100%)	-	Заразились все мыши. Многочисленные ларвоцисты найдены в печени, в брюшной полости, 15-20 мм в диаметре, в большинстве своем сформировавшиеся протосколексы

* - иммунизация 3-кратная, интервал 10 дней

** - заражение через 14 дней после последней иммунизации

Убой экспериментальных животных через 90 дней после проверочного заражения.

Полученные предварительные обнадеживающие результаты дают основание продолжить исследования в этом направлении, уделив наибольшее внимание отработке дозы вводимых антигенов, способу введения и кратности.

Немаловажное, а возможно и основное значение имеет интервал между иммунизациями, поскольку отдаленные сроки введения антигена после первичного иммунизирующего цикла оказывают иммунизаторное воздействие на организм с оптимально завершенной перестройкой иммунологической реактивности и поэтому вызывающей максимальный эффект. Однако получение максимального иммунизирующего эффекта находится в зависимости от подготовительной иммунизации. При введении в организм больших доз антигена или частом антигеном раздражении можно получить обратный эффект.

ВЫВОДЫ

1). Проведено культивирование клеток протосколексов, выделенных из вторичных ларвоцист *E. multilocularis* 2-, 4- и 6- месячного возраста, получены антигены клеточной культуры («клеточные» антигены) с содержанием белка 2175 мкг/мл; 4600 мкг/мл и 3500 мкг/мл соответственно.

2). Реакцией иммунодиффузии (РИД) в агаровом геле проведен иммунохимический анализ «клеточных» антигенов протосколексов из 2, 4 и 6 - месячных вторичных ларвоцист *E. multilocularis* с кроличьей гипериммунной сывороткой к антигенам экстракта протосколексов паразита, сывороткой экспериментально зараженных *E. multilocularis* крыс и сывороткой человека с подтвержденным диагнозом цистного и альвеолярного эхинококкозов и установлено наличие в них идентичных антигенов.

3). В гомологичной системе РИД (гипериммунная кроличья сыворотка к экстракт протосколексов *E. multilocularis*) выявлено не менее 5-6 комплексов антиген-антитело; между этой же антисывороткой и антигенами клеточной культуры протосколексов из 2, 4 и 6 - месячных вторичных ларвоцист *E. multilocularis* проявлялась не более 1-2 комплексов антиген-антитело, представленных в РИД идентичными полосами преципитации.

4). Установлено наличие в «клеточных» антигенах протосколексов 2, 4 и 6-месячных вторичных ларвоцист *E. multilocularis* диагностического антигенного компонента, способного выявлять специфические антитела в сыворотках экспериментально зараженных *E. multilocularis* крыс и сыворотках больных цистной и альвеолярной формой эхинококкоза

5). Проведена сравнительная оценка диагностической эффективности «клеточных» антигенов протосколексов из 2, 4 и 6-месячных вторичных ларвоцист *E. multilocularis* иммуноферментной реакцией при цистном эхинококкозе свиней; установлена чувствительность и специфичность теста 75,6; 73,3 и 73,3% и 68,9; 72,1 и 69,6% соответственно.

6). Диагностическая эффективность ИФР с «клеточными» антигенами протосколексов из 2, 4 и 6-месячных вторичных ларвоцист *E. multilocularis* при цистном эхинококкозе человека составила соответственно 89,7, 89,7 и 86,2% по чувствительности и 82,07, 86,2 и 86,2% по специфичности.

7). Изучены иммунопрофилактические свойства «клеточных» антигенов протосколексов из 2, 4 и 6-месячных вторичных ларвоцист *E.*

multilocularis в сравнении с 3-дневными экскреторно-секреторными продуктами культивируемых протосколексов паразита при экспериментальном вторичном альвеолярном эхинококкозе мышей. Эффективность защиты составила 75,0; 75,0, и 66,7%; 58,3% соответственно. Показано усиление иммунной защитной реакции под действием «клеточных» антигенов протосколексов в комплексе с иммуномодулятором риботаном и адьювантом Фрейнда.

8) Установлено, что 3-кратная подкожная иммунизация мышей «клеточным» антигеном протосколексов из 2, 4 и 6-месячных вторичных ларвоцист *E. multilocularis* в комплексе с иммуномодулятором риботаном (доза 80 мкг белка и 5 мкл риботана), предохраняла большинство мышей от заражения инвазивным материалом *E. multilocularis*. Защитный эффект составил 91,7; 91,7 и 83,4%

9) Иммунизация мышей «клеточными» антигенами протосколексов из 2,4 и 6 – месячных ларвоцист *E. multilocularis* в комплексе с полным адьювантом Фрейнда предохраняла их от последующего заражения *E. multilocularis* на 80,0; 90,0 и 70,0% соответственно.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Материалы диссертационной работы вошли в «Методику идентификации "клеточных" антигенов эхинококка», одобренную секцией «Инвазионные болезни животных» Отделения ветеринарной медицины РАСХН и в заявку на изобретение «Способ профилактики вторичного альвеолярного эхинококкоза (гидатидоза)» Получено положительное решение на выдачу патента №2004129658/13(032366) от 11.10.2004

Установленная иммунохимическим анализом идентичность антигенов-метаболитов культивируемых в искусственной питательной среде клеток протосколексов *E. multilocularis*, выделенных из 2-, 4 – и 6-месячных ларвоцист паразита, доказывает экономическую целесообразность использования в культуральной работе для получения «клеточных» антигенов эхинококков ларвоцисты *E. multilocularis* не более 3-4-месячного возраста, что позволит сократить как срок содержания инвазированных экспериментальных животных, так и затраты на их кормление.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Бережко В.К., Руднева О.В. Диагностические свойства антигенов клеточной культуры *Echinococcus multilocularis* // Материалы докл. науч. конф. «Теория и практика борьбы с паразитарн. болезнями»-2003, вып.4, с.76-78.
2. Бережко В.К., Руднева О.В., Далаева И.Б. Иммунохимический анализ метаболитов клеточной культуры протосколексов *Echinococcus multilocularis* // Материалы докл. науч. конф. «Теория и практика борьбы с паразитарн. болезнями» - 2004, вып. 5, с. 63-66.
3. Руднева О.В. Культивирование клеток цестод, как способ получения диагностических антигенов// Материалы докл. науч. конф. «Теория и практика борьбы с паразитарн. болезнями»-2004, вып.5. – с.336-339.
4. Руднева О.В., Бережко В.К. Иммунопрофилактические свойства «клеточных» антигенов протосколексов *Echinococcus multilocularis* разного возраста. // В сб «Теория и практика борьбы с паразитарн. болезнями»-2005. – вып.6 – с.306-309.
5. Руднева О.В. Диагностическая эффективность клеточных метаболитов-антигенов протосколексов ларвоцист *Echinococcus multilocularis* при цистном эхинококкозе.// Тр. Всес. ин-та гельминтол. -- 2005. – т.41. – с.305-311.
6. Бережко В.К., Руднева О.В. Иммунопрофилактика ларвальных цестодозов (достижения, перспективы)// Тр. Всес. ин-та гельминтол. – 2005. – т.41. – с.86-101.
7. О.В.Руднева, И.Б.Далаева, В.К.Бережко Иммунохимический анализ и диагностическая эффективность «клеточных» антигенов *Echinococcus multilocularis* при эхинококкозе свиней// Тр. Всес. ин-та гельминтол. – 2006. –т.42. – с.
8. Бережко В.К., Руднева О.В. Методика идентификации «клеточных» антигенов эхинококков // Тр. Всес. ин-та гельминтол. –2006.- т.42.-с.

Принято к исполнению 13/02/2006
Исполнено 14/02/2006

Заказ № 74
Тираж: 100 экз

ООО «11-й ФОРМАТ» ИНН 7726330900
Москва, Варшавское ш., 36
(495) 975-78-56
(495) 747-64-70
www.autoreferat.ru

2006A

4659

P-4659